



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 100 58 397 A 1

51 Int. Cl. 7:  
G 01 N 27/403  
G 01 N 27/416

21 Aktenzeichen: 100 58 397.0  
22 Anmeldetag: 24. 11. 2000  
43 Offenlegungstag: 6. 6. 2002

DE 100 58 397 A 1

71 Anmelder:  
Siemens AG, 80333 München, DE

72 Erfinder:  
Gumbrecht, Walter, Dr., 91074 Herzogenaurach, DE;  
Mund, Konrad, Dr., 91080 Uttenreuth, DE; Stanzel,  
Manfred, Dr., 91056 Erlangen, DE

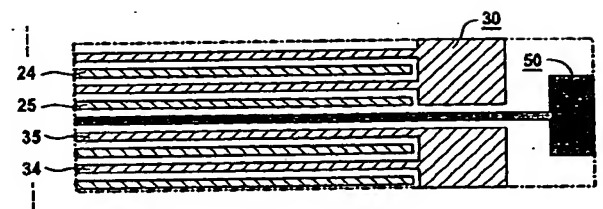
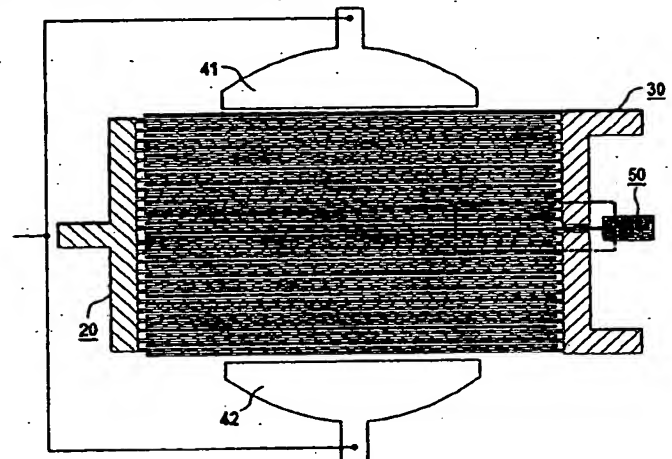
56 Entgegenhaltungen:  
DD 301 93 0A9  
WO 00 62 048 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Anordnung für ein elektrochemisches Analyseverfahren und deren Verwendung

57 Eine solche Anordnung enthält ein Elektrodensystem aus wenigstens drei Elektroden, wobei wenigstens eine Arbeitselektrode, eine Gegenelektrode und eine Referenzelektrode vorhanden sind. Gemäß der Erfindung ist die Referenzelektrode (R) derart angeordnet, dass sie zumindest Teilbereichen der zwei weiteren Elektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ , C) benachbart ist. Vorzugsweise ist sie von diesen Teilbereichen gleich beabstandet. Das Elektrodensystem ist für das Redoxrecycling oder zum Erfassen von enzymgekoppelten Nachweisreaktionen geeignet.



DE 100 58 397 A 1

- [0001] Die Erfindung bezieht sich auf eine Anordnung für ein elektrochemischen Analyseverfahren, mit einem Elektrodensystem aus wenigstens drei Elektroden, wobei wenigstens eine Arbeitselektrode, eine Gegenelektrode und eine Referenzelektrode vorhanden sind. Daneben bezieht sich die Erfindung auch auf spezifische Verwendungen der Anordnung mit dem Elektrodensystem.
- [0002] Bei elektroanalytischen Verfahren (siehe z. B. W. Buchberger "Elektrochemische Analyseverfahren" Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1998), Berlin) werden häufig Referenzelektroden benötigt, die ein vom Analyten unabhängiges stabiles Bezugspotential liefern müssen.
- [0003] Eine klassische Referenzelektrode ist z. B. die Ag/AgCl-Elektrode, die aus folgender Anordnung besteht: el. Leiter/Silber/Silberchlorid/KCl-Lösung/Diaphragma. Solche Referenzelektroden sind in ihren Ausführungsformen relativ komplex aufgebaut und benötigen Volumina von einigen cm<sup>3</sup>.
- [0004] Viele elektroanalytische Verfahren werden mit Hilfe der Technologien der Mikroelektronik und Mikrosystemtechnik miniaturisiert (Volumina wenige mm<sup>3</sup>), wobei jedoch die Möglichkeiten der Miniaturisierung von Referenzelektroden begrenzt sind.
- [0005] Es kann z. B. eine Ag/AgCl-Schicht in Dünnschichttechnik ausgeführt werden und anstelle eines KCl-Lösungsvolumens eine definierte Chlorid-Ionen-Konzentration dem Analyten zugefügt werden.
- [0006] Bei einigen mikro-elektroanalytischen Verfahren ist jedoch der Einsatz von Ag/AgCl-Schichten unerwünscht. Gründe dafür sind eine unvermeidbare Kontaminationsgefahr, fehlende Prozesskompatibilität und hohe Kosten.
- [0007] Bei einer speziellen Form der amperometrischen Analyse wird an einer Arbeitselektrode W<sub>ox</sub> ein zu detektierender Stoff A<sub>red</sub> zu A<sub>ox</sub> oxidiert und an einer benachbarten Arbeitselektrode W<sub>red</sub> wieder zu A<sub>red</sub> reduziert. Dieser Vorgang des sog. Redoxrecyclings (Literatur: K. Aoki et al., J. Electroanal. Chem., 256 (1988), Seiten 269 bis 282, O. Niwa et al., Anal. Chem., 65 (1993), Seiten 1559 bis 1563) führt zu einer Signalverstärkung.
- [0008] Aufgabe der Erfindung ist es daher, eine Anordnung der eingangs genannten Art zu schaffen, mit der die Messungen bei elektrochemischen Analyseverfahren verbessert werden.
- [0009] Die Aufgabe ist erfindungsgemäß durch die Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Weiterbildungen der Erfindung sind in den abhängigen Sachansprüchen angegeben. Weiterhin enthält die Erfindung auch bevorzugte Anwendungen der beschriebenen Anordnung mit dem Elektrodensystem.
- [0010] Bei der Erfindung beinhaltet die Anordnung eine besondere Platzierung der Referenzelektrode im Elektrodensystem. Offensichtlich ist die Tatsache, dass es sich beim analytischen Verfahren um Redoxrecycling handelt. Dabei ist an sich bekannt und wird vorausgesetzt, dass ein Redox-Paar, d. h. Gemisch aus oxidiert und reduzierter Form einer Verbindung A an einer elektrochemisch aktiven (Edel-)Metallelektrode in Lösung ein sog. Redox-Potential ausbildet. Dieses Redox-Potential lässt sich zur Realisierung einer Referenzelektrode ausnutzen.
- [0011] Für einen Sensor auf der Basis des Redoxrecycling-Verfahrens braucht man Arbeitselektroden W<sub>red</sub> und W<sub>ox</sub>, eine Gegenelektrode C und eine Referenzelektrode R. Mit der Erfindung wird die Referenzelektrode hinsichtlich der Potentialmessung besonders vorteilhaft ausgestaltet. Vorzugsweise sind alle Elektroden aus dem gleichen Material, insbesondere einem Edelmetall, ausgebildet.
- [0012] Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen jeweils schematisch
- [0013] Fig. 1 eine Anordnung für das Redoxrecycling,
- [0014] Fig. 2 die Draufsicht auf ein Elektrodensystem mit zwei Arbeitselektroden zur Verwendung bei Fig. 1,
- [0015] Fig. 3 eine Abwandlung von Fig. 2 mit nur einer Arbeitselektrode,
- [0016] Fig. 4 die Draufsicht auf ein Elektrodensystem mit parallel kreisförmig ausgebildeten Elektrodenfingern und
- [0017] Fig. 5 den Querschnitt durch ein Substrat mit Arbeitselektroden und einer Referenzelektrode an der Oberfläche und einer Verarbeitungsschaltung im Innern eines Halbleiters.
- [0018] Fig. 1 zeigt einen Schnitt durch einen Teil einer Elektroden-Anordnung mit Arbeitselektroden 2 und 3 einer Referenzelektrode 5, die sich auf einem Substrat 1 befinden. Es ist ersichtlich, dass die oxidierten Spezies A<sub>ox</sub> an den Arbeitselektroden W<sub>red</sub> reduziert werden, bzw. die reduzierten Spezies A<sub>red</sub> an den Arbeitselektroden (W<sub>ox</sub>) oxidiert werden. Dies führt in den Bereichen der Arbeitselektroden 1 und 2 zu einem zyklischen Prozess, dem sogenannten "Redox-recycling". Die Referenzelektrode 3 ist am hochohmigen Eingang eines nicht dargestellten Messverstärkers angeschlossen, sodass die Spezies A<sub>ox</sub> und A<sub>red</sub>, die von beiden Seiten an die Referenzelektrode 5 herandiffundieren, ein Redoxpotential ausbilden, das sich gemäß der Nernst'schen Gleichung ergibt zu:

$$E = E_0 + RT/zF \cdot \ln(C(A_{ox})/C(A_{red})) \quad (1)$$

Dabei bedeuten

E: Redoxpotential

R: Gaskonstante

T: absol. Temperatur

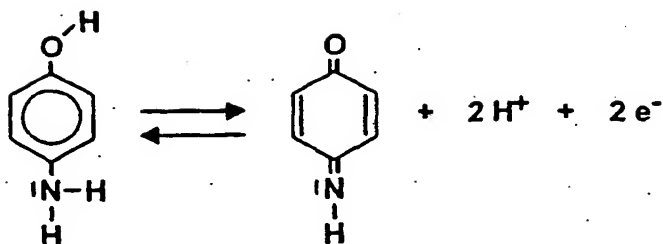
z: Anzahl der Redox.-Elektronen

F: Faraday-Konstante

C(): Konzentration der Spezies ()

- [0019] Die messtechnische Erfassung eines solchen Redoxpotentials erfordert eine hochohmige Referenzelektrode. Mitentscheidend für die Funktion eines solchen Referenzelektroden-Prinzips ist die Tatsache, dass das Redox-Potential nicht von den Absoluten Konzentrationen der oxidierten und reduzierten Spezies abhängt, sondern von dem Konzentrations-Verhältnis C(A<sub>ox</sub>)/C(A<sub>red</sub>).

[0020] Als Beispiel für ein Redoxpaar sei p-Aminophenol/Chinonimin genannt:

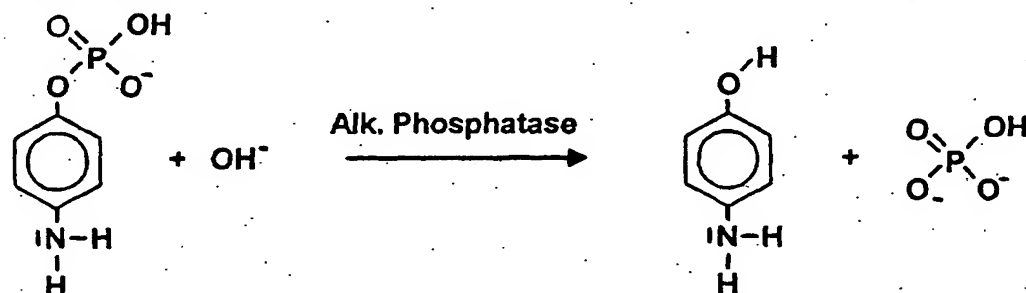


p-Aminophenol

Chinon-imin

[0021] Am entsprechenden Redoxprozess sind 2 Elektronen sowie 2  $\text{H}^+$ -Ionen beteiligt.

[0022] Dieses System kommt z. B. bei Enzym-gekoppelten Nachweisreaktionen zum Einsatz. Dabei wird das Enzym "Alkalische Phosphatase" als Label- bzw. Verstärkungs-Substanz eingesetzt. Alkalische Phosphatase ist in der Lage, p-Aminophenyl-Phosphat in p-Aminophenol und Phosphat zu spalten:



p-Aminophenyl-Phosphat

[0023] Das entstehende p-Aminophenol wird am Elektroden-System oxidiert bzw. das Redoxpaar p-Aminophenol/Chinonimin zyklisiert.

[0024] Vorteilhaft für die Funktion der Referenzelektrode ist die Tatsache, dass das Enzym-Substrat p-Aminophenylphosphat stets teil-hydrolysiert vorliegt und somit Spuren (ca. 0,1%) von p-Aminophenol vorliegen, die ihrerseits teil-oxidiert sind somit kleine Konzentrationen des Redoxpaares p-Aminophenol/Chinon-imin vorliegen.

[0025] Aufgrund der logarithmischen Beziehung in Gleichung 1 ergeben sich selbst bei erheblichen Konzentrationsunterschieden von oxidiert und reduzierter Form nur verhältnismäßig kleine Abweichungen des Redoxpotentials: Letzteres wird an folgendem Beispiel erläutert: Unter der Annahme, dass das p-Aminophenol/Chinon-imin-Verhältnis nicht 1, sondern 100/1 wäre, d. h. nur 1% des p-Aminophenols wäre zu Chinon-imin oxidiert, so ergäbe sich aufgrund der Nernst'schen Gleichung ein Unterschied des Redoxpotentials und somit der Referenzelektroden-Spannung von lediglich ca. 60 mV.

[0026] Somit würde eine Abweichung von 60 mV für die beiden Arbeitselektroden resultieren. Der Vorgang des Redox-Recyclings wird durch diese Abweichung kaum gestört, da die Spannungs-Differenz zwischen den beiden Arbeitselektroden ( $W_{\text{ox}}$  und  $W_{\text{red}}$ ) ca. 400 mV beträgt und aufgrund des Betriebs der Elektroden im Diffusionsgrenzstrom Variationen dieser Größenordnung (60 mV) einen zu vernachlässigenden Einfluss haben. Das Redox-Recycling wird zumindest in Gang kommen, wodurch sich das Verhältnis von p-Aminophenol und Chinon-imin gleich 1 nähert und somit auch die Abweichungen der Referenzelektroden-Spannung gegen Null gehen.

[0027] Fig. 2 zeigt eine Ausführungsform für ein Vier-Elektroden-System, bestehend aus zwei Arbeitselektroden  $W_{\text{ox}}$  und  $W_{\text{red}}$ , die hier als sog. Interdigital-Elektroden 20 und 30 ausgeführt sind, einer Gegenelektrode C, die aus Symmetriegründen mit zwei elektrisch verbundenen Teilelektroden 41, 42 ausgebildet ist, sowie einer Referenzelektrode R.

[0028] Unter "Interdigitalelektrode" wird hier eine Elektrode mit fingerartigen Elektrodenanteilen bezeichnet, wobei zwei Interdigitalelektroden kammartig ineinandergreifen können. Dies bedeutet, dass die Arbeitselektrode 20 parallele Finger 21, 22, ..., 25, ... und die Arbeitselektrode 30 parallele Finger 31, 32, ..., 35, ... aufweist.

[0029] Die Referenzelektrode 50 ist als einzelne "Fingerelektrode" ausgebildet und derart in der Doppelkammstruktur der Arbeitselektroden 20 und 30 angeordnet, dass sie sowohl einem "Finger" 25 als Teil der Arbeitselektrode 20 als auch einem "Finger" 35 als Teilbereichbereich der Arbeitselektrode 30 benachbart ist. Aus dem Detail-Ausschnitt der Fig. 2 ergibt sich weiterhin eine im Wesentlichen konstante Beabstandung der Referenzelektrode 50 von diesen Teilbereichen der Arbeitselektroden 20 und 30.

[0030] In Fig. 2 besteht die Anordnung aus vier Elektroden, d. h. zwei Arbeitselektroden  $W_{\text{ox}}$  und  $W_{\text{red}}$ , einer Referenzelektrode R in erfindungsgemäßer Platzierung und einer bzw. zwei Gegenelektroden C, die aber elektrisch miteinander kontaktiert sind und insofern eine einzige Elektrode darstellen.

[0031] In Fig. 3 ist die Anordnung gemäß Fig. 2 insoweit abgeändert, dass anstelle der zweiten Arbeitselektrode 30 aus Fig. 2 die Gegenelektrode verwendet wird. D. h., neben der Arbeitselektrode W, die entsprechend der Arbeitselektrode 20 mit Fingern 21, 22, ..., 25, ... ausgebildet ist, hat die Gegenelektrode 40 die identische Form mit einzelnen Fingern 41, 42, ..., 45, ..., wobei in diesem Fall die Arbeitselektrode W und die Gegenelektrode C mit ihren Fingern 21, 22, ...

bzw. 42, 42, ... kammartig ineinandergreifen.

[0032] In der Fig. 4 ist eine Elektrodenanordnung dargestellt, die von prinzipiellem Aufbau aus der DE 196 10 115 A1 vorbekannt ist. Die Elektrodenanordnung gemäß Fig. 4 hat ebenfalls zwei Arbeitselektroden  $W_{ox}$  und  $W_{red}$  mit jeweiligen Fingern, die hier kreisförmig parallel verlaufen. Dies bedeutet im Einzelnen, dass von zwei parallelen und radialen Elektrodenanschlüssen 120 und 130 einzelne Finger 121, 122, ... bzw. 131, 132, ... jeweils gegenläufig parallel koaxial verlaufen und insgesamt eine Kreisfläche umschließen. Eine solche Elektrodenanordnung ist flächenmäßig kompakt. Um den kreisförmigen Aufbau ist eine ringförmig ausgebildete Gegenelektrode 140 angeordnet.

[0033] Darüber hinaus ist in Fig. 4 ebenfalls eine Referenzelektrode 50 als einzelne Fingerelektrode vorhanden, die parallel zwischen den Anschlüssen 120 und 130 der Messelektroden  $W_{ox}$  und  $W_{red}$  radial verläuft. Sie ist also Teilbereichen der Arbeitselektroden benachbart und im Wesentlichen diesen Teilen gleich beabstandet.

[0034] In Fig. 5 ist eine Anordnung entsprechend Fig. 1 dargestellt, die jeweils wieder Arbeitselektroden  $W_{ox}$  und  $W_{red}$ , eine zugehörige Referenzelektrode R sowie eine Gegenelektrode C auf einem Substrat zeigt, das hier mit 10 bezeichnet ist. Als Substrat 10 dient beispielsweise Silizium, das kristallographisch orientiert ist und gleichermaßen Träger von elektrischen Schaltelementen zur Auswertung und/oder Verstärkung ist. Dargestellt sind Verstärker 15 bis 17 und Rückkopplungswiderstände 18, wobei insbesondere der Operationsverstärker 15 für die Funktionsweise der Referenzelektrode R von Bedeutung ist. Die Referenzelektrode R liegt am hochohmigen Eingang des Verstärkers 15, wobei deren Ausgang an die Gegenelektrode C angeschlossen ist. Der andere Eingang des Verstärkers 15 liegt am Referenzpotential  $U_{Ref}$ .

[0035] Mit den weiteren Operationsverstärkern 16 bzw. 17 lässt sich bei Anschluss an die Arbeitselektrode  $W_{ox}$  und dem zugehörigen Potential  $U_{ox}$  der Spannungsabfall  $U = R \cdot I_{ox}$  messen und bei Kenntnis des Widerstandswertes R vom Rückkopplungswiderstand 18 die Größe  $I_{ox}$  bestimmen. Gleiches gilt für  $I_{red}$  an der Arbeitselektrode  $W_{red}$ .

[0036] Die Anordnung gemäß Fig. 5 lässt sich in einfacher Weise zu einem ein- oder zweidimensionalen Array erweitern. Statt Silizium sind für das Substrat auch andere Materialien, beispielsweise Kunststoff, Glas oder Keramik, möglich. In diesem Fall ist die Auswerteschaltung aus diskreten Bauelementen aufgebaut.

[0037] Wesentlich ist in Fig. 5, dass die Referenzelektrode in eine Auswerteschaltung eingebunden ist, die entweder analog oder digital aufgebaut sein kann. Durch die unmittelbare Anbindung der Referenzelektrode an den hochohmigen Eingang des Verstärkers ist eine weitgehend störungsfreie Messung des Redox-Potentials möglich.

[0038] Insgesamt bildet das Elektrodensystem mit dem zugehörigen Substrat für elektrochemische Analyseverfahren eine komplette Messanordnung, die beispielsweise zum Redoxrecycling oder auch zum Erfassen von enzymgekoppelten Nachweisreaktionen geeignet ist.

#### Patentansprüche

1. Anordnung für ein elektrochemisches Analyseverfahren, mit einem Elektrodensystem aus wenigstens drei Elektroden, wobei wenigstens eine Arbeitselektrode, eine Gegenelektrode und eine Referenzelektrode vorhanden sind, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenzelektrode (R) zumindest Teilbereichen von zwei der weiteren Elektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ , C) benachbart ist.
2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenzelektrode (R) von den benachbarten Teilbereichen der weiteren Elektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ , C) gleich beabstandet ist.
3. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Arbeitselektrode (W), eine Gegenelektrode (C) und eine Referenzelektrode (R) vorhanden sind.
4. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zwei Arbeitselektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ ), eine Gegenelektrode (C) und eine Referenzelektrode (R) vorhanden sind.
5. Anordnung nach Anspruch 1 und Anspruch 4, wobei zwei Arbeitselektroden vorhanden sind, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ ) gleich und jeweils kammartig mit einzelnen Fingern (21, 22, ..., 25, ...) ausgebildet sind und dass die Arbeitselektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ ) mit den einzelnen Fingern (31, 32, ..., 35, ...) ineinandergreifen, wobei die Referenzelektrode (R) sowohl einem Finger (25) der ersten Arbeitselektrode ( $W_{ox}$ ) als auch einem Finger (35) der zweiten Arbeitselektrode ( $W_{red}$ ) benachbart ist.
6. Anordnung nach Anspruch 1 und Anspruch 3, wobei eine Arbeitselektrode vorhanden ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektrode (W) und die Gegenelektrode (C) gleich und jeweils kammartig mit einzelnen Fingern ausgebildet sind und dass die Arbeitselektrode (W) und die Gegenelektrode (C) mit den einzelnen Fingern (21, 22, ..., 25, ..., 41, 42, ..., 45, ...) ineinandergreifen, wobei die Referenzelektrode (R) sowohl einem Finger (20) der Arbeitselektrode (W) als auch einem Finger (45) der Gegenelektrode (C) benachbart ist.
7. Anordnung nach Anspruch 4 und Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ ) und die Referenzelektrode (R) parallel verlaufen und eine Rechteckfläche bilden.
8. Anordnung nach Anspruch 3 und Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektrode (W), die Gegenelektrode (C) und die Referenzelektrode (R) parallel verlaufen und eine Rechteckfläche bilden.
9. Anordnung nach Anspruch 4 und Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ ) und die Referenzelektrode (R) parallel kreisförmig verlaufen und eine Kreisfläche bilden.
10. Anordnung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ ) und die Gegenelektrode (C) von radialen Anschlüssen (120, 130) ausgehend parallel kreisförmig verlaufen und die Kreisfläche bilden, wobei die Referenzelektrode (R) radial und parallel zwischen den Anschlüssen (120, 130) der Arbeitselektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ ) verläuft.
11. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass alle Elektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ , C, R) aus dem gleichen Material bestehen.
12. Anordnung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ , C, R) aus Edelmetall gebildet sind.
13. Anordnung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Elektrodensystem auf einer planaren Unter-

lage (1) eines geeigneten Materials, wie beispielsweise Kunststoff, Glas, Keramik oder insbesondere Silizium, angeordnet ist.

14. Anordnung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterlage ein kristallographisch orientiertes Silizium-Substrat (10) ist.

15. Anordnung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenzelektrode (R) am hochohmigen Eingang eines Messverstärkers (15) angeschlossen ist, wobei der Messverstärker (15) durch Integration im Silizium Substrat (10) gebildet ist und aufgrund des kurzen Anschlussweges eine störungsfreie Potentialmessung ermöglicht.

16. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Silizium-Substrat (1,10) mit den Elektroden ( $W_{ox}$ ,  $W_{red}$ , C, R) ein Arraysystem bildet.

17. Verwendung einer Anordnung mit wenigstens einem Elektrodensystem nach Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 16 für das Redoxrecycling.

18. Verwendung einer Anordnung mit wenigstens einem Elektrodensystem nach Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 16 zum Messen von enzymgekoppelten Nachweisreaktionen.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

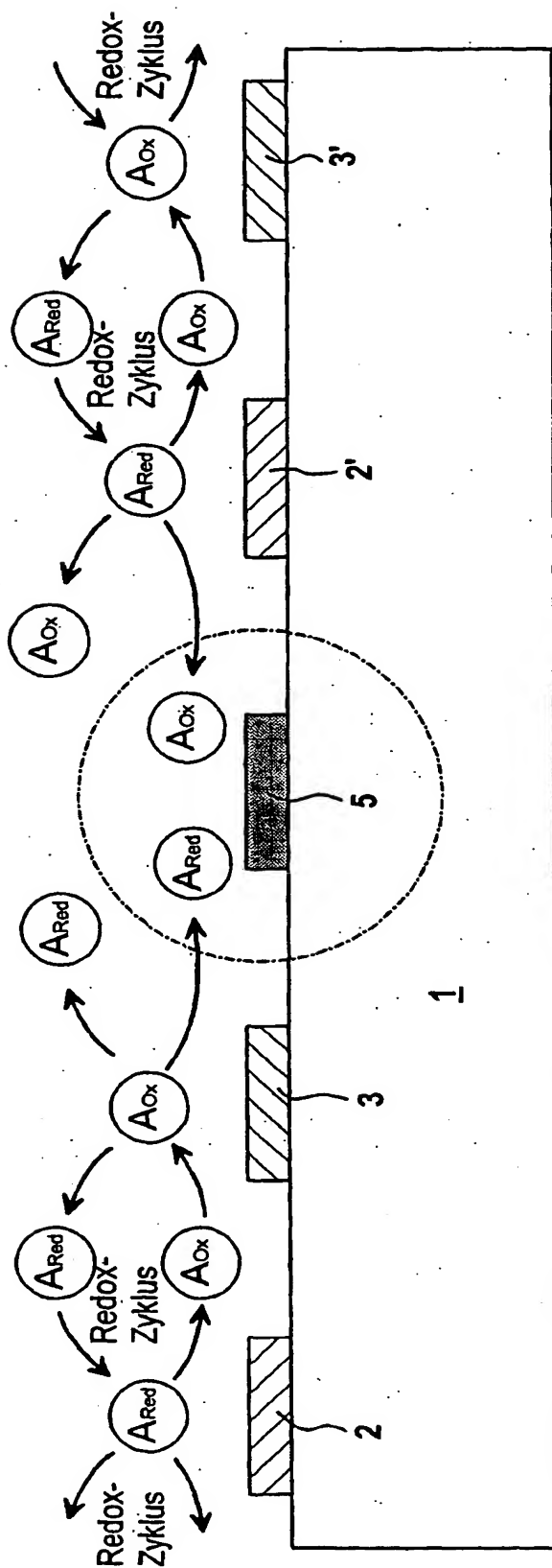


FIG 1

Best Available Copy

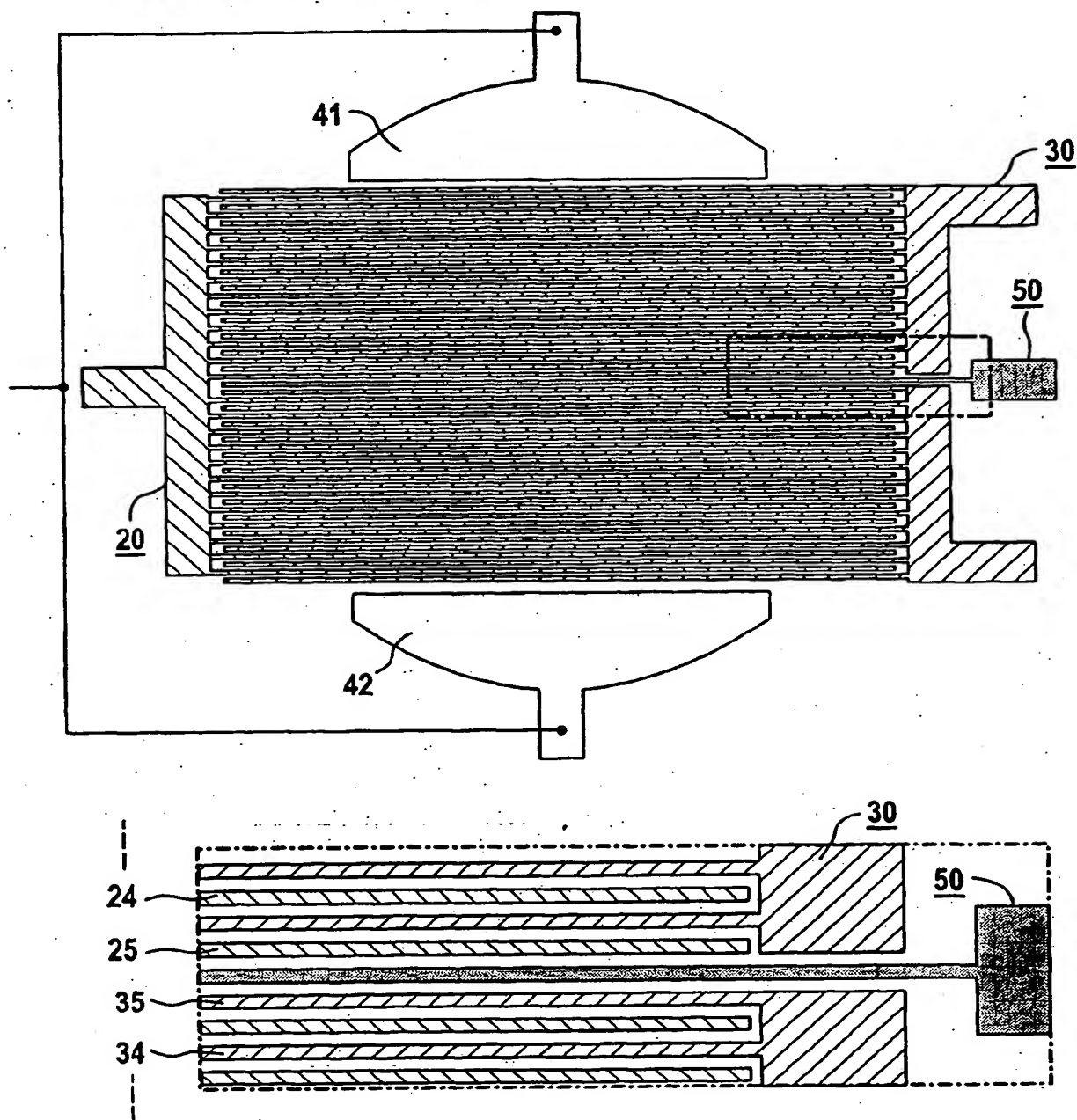
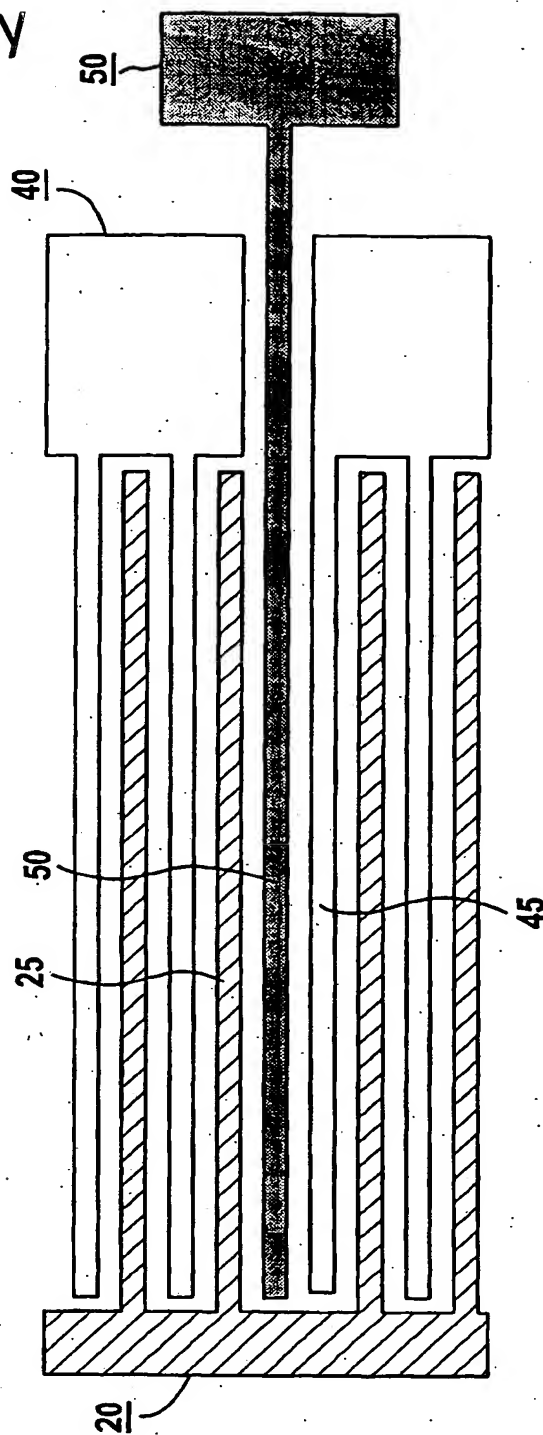


FIG 2

Best Available Copy





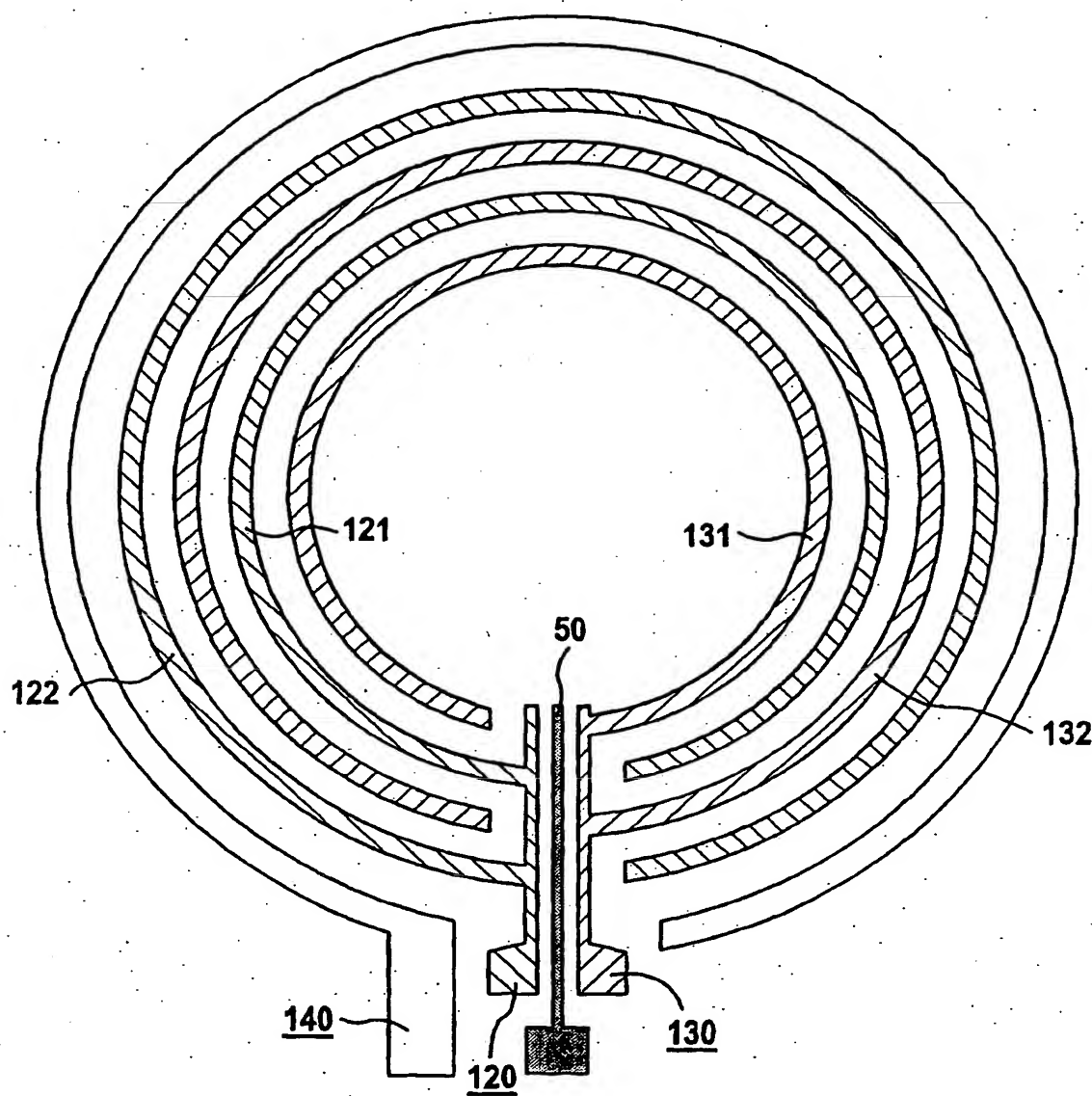


FIG 4

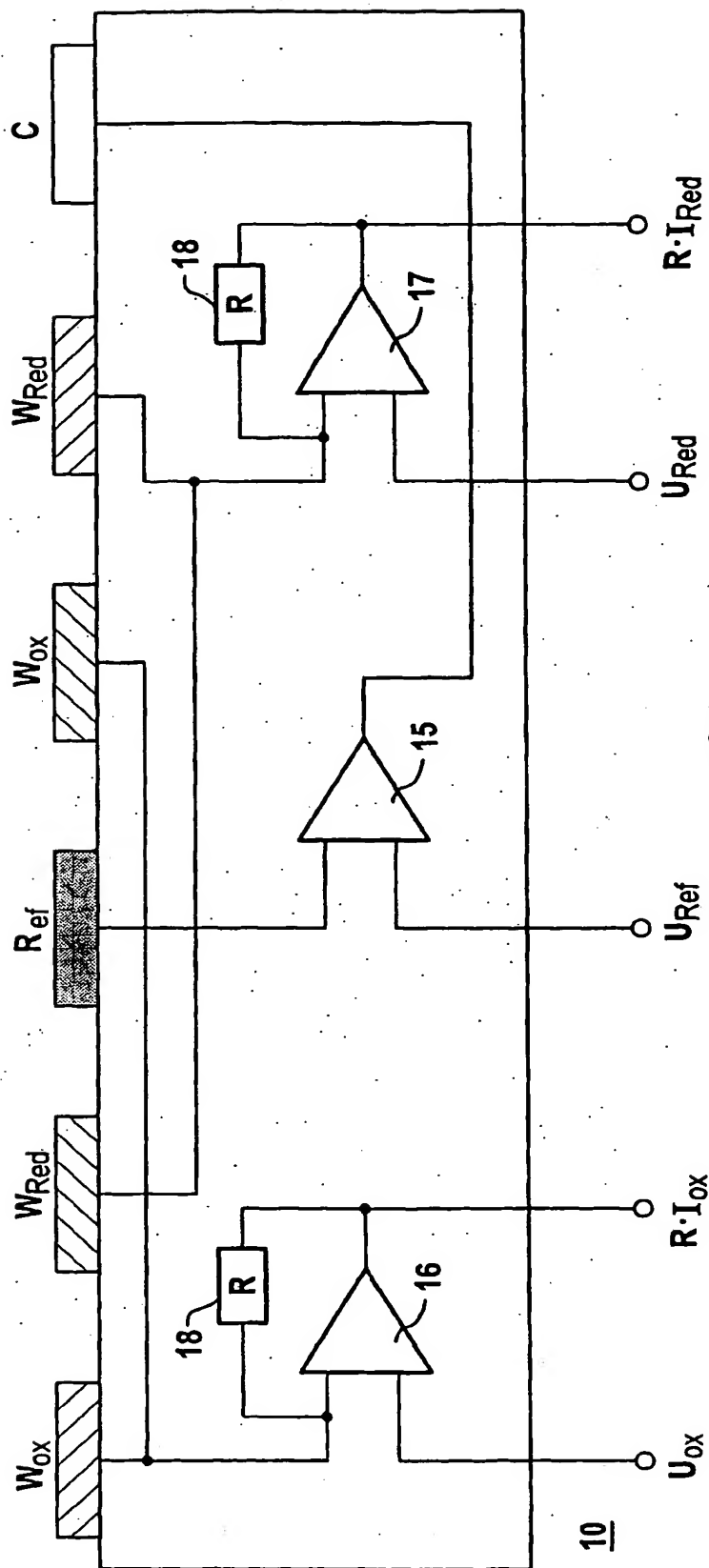


FIG 5